

รายการอ้างอิง

- Arnold, R. G., Shahani, R. M., and Dwivedi, B. K. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. Journal of Dairy Science. 58: 1127-1143.
- Baltz, R. 1986. Strain Improvement. In Demain, A.L., and Solomon, N.A. (eds.), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. New York: The United States of America Press. :154-169
- Bapiraju, K. V. V. S. N., Sujatha, P., Ellaiah, P., and Ramana, T. 2004. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. African Journal of Biotechnology. 3: 618-621.
- Barroso, G., Mai, T.T., and Labarere, J. 1988. Effect of UV irradiation on germination and on chloramphenicol and tetracycline resistance of *Volvariella volvacea* basidiospores. Mushroom Journal for the Tropics. 83: 73-84.
- Booth, C. 1977. Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species. commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bosley, A., and Pielow, A. 1997. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. Journal of American Oil Chemists Society. 74: 107-111.
- Brockerhoff, H., and Jensen, R. G. 1974. Lipolytic enzyme. New York: Academic press.
- Burgess, L. W., and Liddell, C. M. 1983. Laboratory manual for Fusarium research. Fusarium Research Laboratory, Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney, Australia
- Cardenas, F., and Castro, M. S. 2000. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme and Microblal Technology. 28: 145-154.
- Cardenas, F., Alvarez, E., Castro-Alvarez, M. S. de., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., and Elson, S. W. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 14: 111-123.

- Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 193-197.
- Fantini, A. A. 1975. Strain Development. John, H.H. (ed.) Method in Enzymology. Antibiotic. Academic Press. New York. 43: 24-41.
- Fryer, T. F., Lawrence, R. C., and Reiter, B. 1967. Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. Journal of Dairy Science. 50: 477-484.
- Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92: 405-416.
- Gao, X.-G., Cao, S.-G., and Zhang, K.-C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme and Microbial Technology. 27: 74-82.
- Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology. 2: 113-118.
- Goodenough, U. 1978. Genetics. 2nd ed. London: Holt, Rinehart and Winston.
- Gupta, N., Rathi, P., and Gupta, R. 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase and esterases. Analytical Biochemistry. 331: 98-99.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., and Bradoo, S. 2004. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology Applied Biochemistry. 37: 63-71.
- Hag, I.U., Javed, s. and Ashraf, H. 2002. Production of amyloglucosidase by UV Irradiated strain of *Aspergillus niger*. Biotechnology. 1:34-39.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 16: 53-58.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., and Fukuda, H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. Journal of Bioscience and Bioengineering. 91: 12-15.

- Kennedy, J. F., and Melo, E. H. M. 1990. Immobilized enzymes and cells. Chemical Engineering Process. 86: 81-89.
- Kouker, G., and Jaeger, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology. 53: 211-213.
- Kuhad R.C. Kumar, M. and Singh A. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Letters in Applied Microbiology. 19: 397-400.
- Li, S. and Chang, S.T. 1991. Selection and characterization of crystal-violet- and malachite-green-resistant mutant in *Volvariella volcacea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7: 541-550.
- Maria, M. M. D., and Heasley, A. 1999. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76: 23-27
- Ma, F. R., and Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. 70: 1-15.
- Macrae, A. R. William M. F. 1983. Extracellular Microbial Lipase. In Fogarty WM (ed) Microbial Enzyme and Biotechnology. New York: Applied Science Publishers, 225-250
- Minovska, V., Winkelhausen, E., and Kuzmanova, S. 2004. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. Journal of the Serbian Chemical Society. 70: 609-624.
- Miura, M., Deguchi, T., Matsubara, M., and Kakezawa, M. 1997. Isolation of Manganese peroxidase-producing mutants of the hyper-lignolytic fungus IZU-154 under nitrogen nonlimiting conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 83: 191-193.
- Posorske, L. H. 1984. Industrial-scale application of enzyme to fat and oils industry. Journal of American Oil Chemists Society. 61: 1758-1760.
- Rosu, R., Uozaki Y., Iwasaki Y., and Yamane T. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. Journal of American Oil Chemists Society. 74: 445-450.

- Samad, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. M. Z. W., Ampon, K., and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. Journal of Microbiological Methods. 9: 51-56
- Samukawa, T., Kaieda M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 90: 180–183.
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G. W., Roshini, K. T., and Shantala, Y. M., 2007. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. African Journal of Biotechnology. 6: 564-568.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochimica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism. 1214: 43-53.
- Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19: 627-662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17: 133-142.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., and Wieczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microbial Technology. 10: 492-497.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C. and Deng, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. Process Biochemistry. 39: 459-465.
- Wahler, D., and Reymond, J. R. 2001. Novel methods for biocatalyst screening. Current Opinion in Chemical Biology. 5: 152–158.
- Walt, D.R., and Agayn, V. 1994. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, Trends in Analytical Chemistry 13: 425–430.

- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17: 151-155.
- White, T. J, Bruns, T. D, Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York, USA: Academic Press. : 315-322.
- Winkler, K. U., and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology. 138: 663-670.
- Wu, X. Y., Jääskeläinen, S., and Linko, Y.Y. 1996. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme Microbial Technology. 19: 226-231.
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytologist. 144: 55- 63.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

- มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
- น้ำตาลเดสโทรส (Dextrose)	20	กรัม
- วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
- น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรอกมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลเดสโทรสแล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทไฮ มีเดีย (Hi media)

PDA 39 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

2. อาหารแข็ง PDB (Potato Dextrose Broth)

- มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
- น้ำตาลเดสโทรส (Dextrose)	20	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรอกมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลเดสโทรสแล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทไฮ มีเดีย (Hi media)

PDA 24 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

3. BYPO Agar + Rhodamine B

- แบคโต-ทริบโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
- เนื้อสกัด (Beef extract)	5	กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	7	กรัม

- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ไขมัน 20 กรัม
- 10 % (v/v) Palm oil emulsion เตรียมใน 10 % (w/v) Gum Arabic solution
- โรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v)

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Lipase production medium

- ผงแป้งถั่วเหลือง (Soybean flour) 75 กรัม
- น้ำตาลกลูโคส (Glucose) 20 กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม
- โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) 1 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) 0.5 กรัม
- น้ำมันปาล์ม (Palm oil) 10 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิเทอริซิน บี หรือคีโตโคนาโซล

- ผง Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป 0.78 กรัม
- น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
- แอมพิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ
- คีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง PDA สำเร็จในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มจนเดือด ด้วยเครื่องไมโครเวฟเพื่อให้ ไขมันละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำอาหารไปเทในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสารปฏิชีวนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง อย่างใดอย่างหนึ่งตามความเข้มข้นที่ต้องการ

หมายเหตุ : PDA สำเร็จรูป 20 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ

6. อาหารเลี้ยงเชื้อในการโคลน

6.1 Luria-Bertani agar (LB agar)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
- แบคโต-ทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
- วุ้นผง	20	กรัม

เติมน้ำกลั่นแล้วผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้เท่ากับ 7 แล้วปรับจนได้ ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมนยา แอมพิซิลินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

6.2 Luria-Bertani broth (LB broth)

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
- แบคโต-ทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม

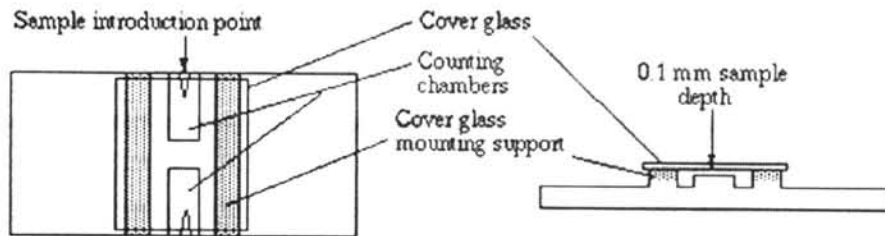
เติมน้ำกลั่นแล้วผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้เท่ากับ 7 แล้วปรับจนได้ ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การนับจำนวนเซลล์และการวัดการเจริญเติบโตของรา

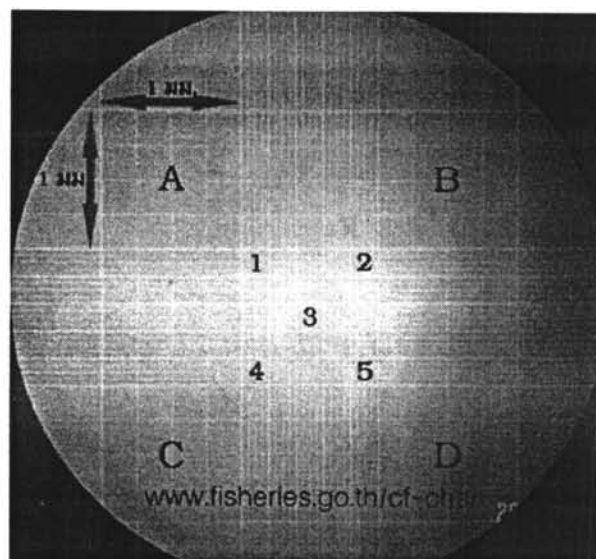
1. การตรวจนับจำนวนเซลล์โดยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)

อุปกรณ์นับเม็ดเลือดเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของรา ลักษณะของอุปกรณ์นับเม็ดเลือดและส่วนประกอบต่าง ๆ ดังรูปที่ ข-1



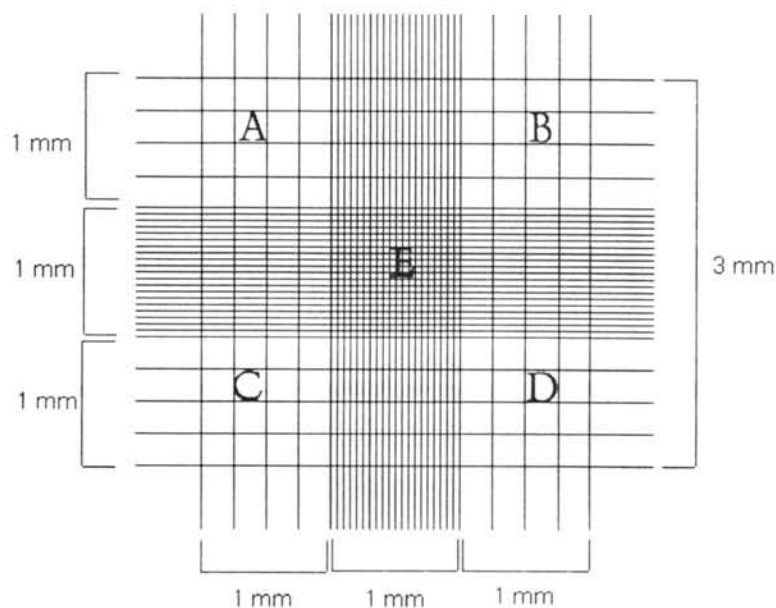
รูปที่ ข-1 รูปวาดแสดงลักษณะของอุปกรณ์นับเม็ดเลือด และส่วนประกอบต่าง ๆ

สไลด์บริเวณที่มีขีดตารางคิดเป็นความลึก 0.1 - 0.2 มิลลิเมตร ตารางที่กำหนดไว้นี้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่มีขีดแบ่งออกเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องจะมีปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (0.05×0.05×0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) เมื่อดูอุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่าจะเห็นตารางสี่เหลี่ยมดังรูปที่ ข-2



รูปที่ ข-2 อุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสปอร์ต่อมิลลิลิตร



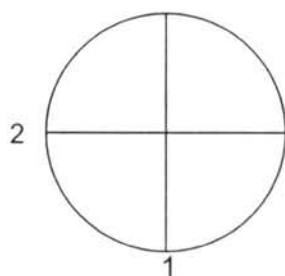
รูปที่ ข-3 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C, D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

$$(A+B+C+D+E) \times 2000 = \text{จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร}$$

เมื่อ A, B, C, D และ E คือบริเวณที่ใช้ับจำนวนตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

2. การวัดการเจริญของเส้นใยบนอาหารแข็ง

การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยบนอาหารแข็งให้ขีดเส้นตรงลงบนจานแก้ว (petridish) ด้านล่างเป็นสองแนว ให้ตั้งฉากกันแล้วจึงวัดการเจริญตามแนวเส้นที่ขีดไว้ ดังรูป



ภาคผนวก ค
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดค่าแอกทิวิตี

1.1 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl)

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ทริส เบส (Tris base)	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย ทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	475	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลาย ก.

พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate)	30	ไมโครกรัม
2-โพรพานอล (2-propanol)	10	มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย ข.

ไตรตอน เอกซ์ -100 (triton x -100)	0.4	กรัม
กัม อะราบิก (gum arabic)	0.1	กรัม

ละลายในทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย ก. และ ข. ที่เตรียมไว้ให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา โดยสามารถเก็บได้ 2 สัปดาห์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

2.1 สารละลายไบยูเรต (biuret reagent)

1% คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.5	มิลลิลิตร
2% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	0.5	มิลลิลิตร
2% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)		
ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M NaOH)	50	มิลลิลิตร

2.2 สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

3. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1 ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ทริส เบส	121 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย ทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA	186.10 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 Washing buffer

PVP (polyvinylpyrrolidone)	2 กรัม
กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)	1.76 กรัม
ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20 มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)	4 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 2X CTAB lysis buffer

CTAB	4 กรัม
ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20 มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	8 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	16.36 กรัม
2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol)	1 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.5 คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24: 1 v/v)

คลอโรฟอร์ม (chloroform)	192	มิลลิลิตร
ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol)	8	มิลลิลิตร

3.6 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG)

PEG	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.7 Tris-EDTA buffer (TE buffer)

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	10	มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. สารเคมีในการทำพีซีอาร์ และอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1 Bovine serum albumin

Bovine serum albumin	20	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 10X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

Tris (hydroxymethyl) amino methane	54	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
กรดบอริก (boric acid)	27.50	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.3 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

เอธิเดียมโบรไมด์	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 1% Agarose gel (w/w)

อะกาโรส (agarose)	1	กรัม
0.5 X TBE	100	มิลลิลิตร
เอธิเดียมโบรไมด์	4	ไมโครลิตร

5. สารเคมีในการโคลน

5.1 X-gal

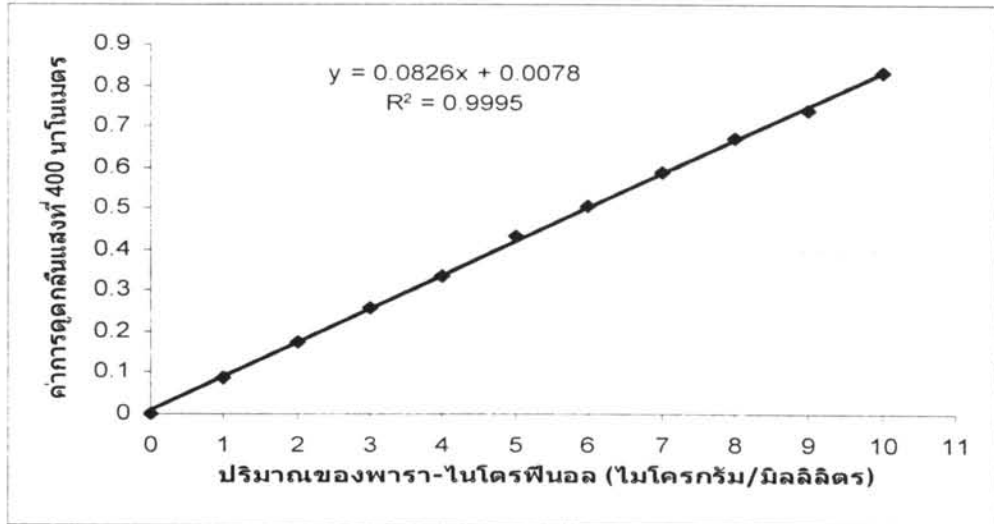
X-gal	100	มิลลิกรัม
N, N Dimethyl formamide	5	มิลลิลิตร

5.2 IPTG (iso-propylthio- β -galactoside)

IPTG	2	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่มีปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สารที่ใช้: ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

0.1 % (w/v) พารา-ไนโตรฟินอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพารา-ไนโตรฟินอล

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Winkler และ Stuckmann (1979)

1. เตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟินอล 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปเจือจาง 1:100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่มีความเข้มข้นต่างๆที่ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ ง-1

ตารางที่ ง-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

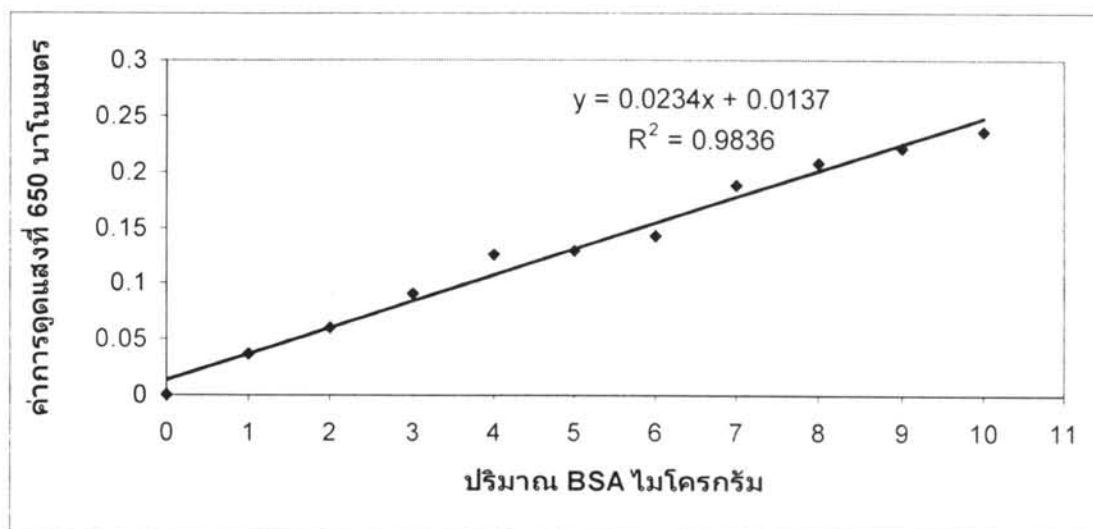
ปริมาณของพารา-ไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	พารา-ไนโตรฟินอล 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	ทริสบัฟเฟอร์ความ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0
0	-	1,000
1	100	900
2	200	800
3	300	700
4	400	600
5	500	500
6	600	400
7	700	300
8	800	200
9	900	100
10	1000	-

4. ดูดสารละลายที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายพารา-ไนโตรฟินอล

5. ตรวจวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟินอลที่ 410 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟินิลปาล์มมิเตท แล้วให้พารา-ไนโตรฟินอล ปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะข้างต้น

2. กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม



รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

1.เตรียมสารละลายไบยูเรต (biuret reagent) ซึ่งประกอบด้วยประกอบด้วย 1% คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร 2% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.5 มิลลิลิตร 2% โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร

2.เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางปริมาณโปรตีนให้ได้ 0-10 ไมโครกรัม โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ง-2

3.นำสารละลายไบยูเรตปริมาตร 200 ไมโครลิตรดูดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตและบ่มกับ BSA 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

4.เตรียมสารละลายฟอสฟอรัสโมลิบดีนัม โดยใส่สารละลายฟอสฟอรัสโมลิบดีนัม 1 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วน และใช้ทันทีปริมาตร 20 ไมโครลิตรในแต่ละหลุมของไมโครเพลตหลังจากบ่มสารในข้อ 3 ครบเวลา 10 นาที โดยผสมให้เข้ากันโดยเร็ว และบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และ แบล็ง (Blank) คือ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนปริมาณ BSA

ตารางที่ ง-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

ปริมาณBSA (ไมโครกรัม)	ปริมาณของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	BSAที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	น้ำกลั่น
0	-	100
1	1	99
2	2	98
3	3	97
4	4	96
5	5	95
6	6	94
7	7	93
8	8	62
9	9	91
10	10	90

ภาคผนวก จ
วิธีการคำนวณ

1. ค่าแอกทिवิตีทั้งหมด (Total activity: units)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของแต่ละเชื้อมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล
ได้สมการดังนี้

$$Y=0.0826X+0.0078$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่า X จากการแทนค่าในสมการ เปลี่ยนหน่วยจาก ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น นาโนโมล (nmol) โดยหารด้วยมวลโมเลกุลของพารา-ไนโตรฟินอล คือ 139.11 หารด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา หารด้วยเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา จะได้เป็นหน่วยยูนิต (units)

2. ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (Total protein: mg)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของแต่ละเชื้อมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (BSA = Bovine serum albumin)
ได้สมการดังนี้

$$Y=0.0234X+0.0137$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่า X จากการแทนค่าในสมการ เปลี่ยนหน่วยจาก ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร เป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถ้ามีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นต้องคูณจำนวนเท่าด้วย

3. แอกทिवิตีจำเพาะ (Specific activity: units/mg)

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสหาได้จากค่าแอกทिवิตีทั้งหมดหารด้วยปริมาณของโปรตีนทั้งหมด

$$\text{Specific activity: units/mg} = \frac{\text{Total activity: units}}{\text{Total protein: mg}}$$

ยูนิต:นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยา ต่อนาที

4. ปริมาณโปรตีนที่ใช่ (protein loading) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency)

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ใช่} = (C_0V_0 - C_1V_1) / W_g$$

กำหนดให้ C_0 = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเฟสก่อนการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

C_1 = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเฟสหลังการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารละลายหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

W_g = น้ำหนักของเอนไซม์ตรึงรูป (กรัม)

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง} = \left\{ \frac{(E_0V_0 - E_1V_1)}{E_0V_0} \right\} \times 100$$

กำหนดให้ E_0 = แอกทิวิตีเริ่มต้นของสารละลายไลเฟสก่อนการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

E_1 = แอกทิวิตีทั้งหมดของสารละลายไลเฟสหลังการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลาย (มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรทั้งหมดหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

5. การหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f)

สูตร

$$R_f = \text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางที่สารเคลื่อนที่ได้} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

หมายเหตุ: สารชนิดเดียวกันจะมีค่า R_f เท่ากัน ถ้าใช้สภาวะเดียวกัน

ค่า R_f จะมีค่าไม่เกิน 1 และไม่มีหน่วย

6. การหาปริมาณน้ำมัน 3 กรัม

$$D = \frac{M}{V}$$

D = ความหนาแน่นของน้ำมันปาล์ม (0.89)

M = มวลน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม (3 กรัม)

V = ปริมาตรของน้ำมันปาล์ม (? มิลลิลิตร)

คำนวณ

$$V = \frac{M}{D}$$

$$V = 0.89 \times 3 = 2.67 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นน้ำมันปาล์ม 3 กรัม มีปริมาตร 2.67 มิลลิลิตร

ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม

น้ำมัน 100 ส่วนใช้ปริมาตรเอนไซม์ 50 ส่วน

น้ำมัน 2.67 มิลลิลิตรใช้ปริมาตรเอนไซม์ 1.34 มิลลิลิตร

ที่เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม

น้ำมัน 100 ส่วนใช้ปริมาตรเอนไซม์ 100 ส่วน

น้ำมัน 2.67 มิลลิลิตรใช้ปริมาตรเอนไซม์ 2.67 มิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ ฉ
สถิติ

ตารางที่ ฉ-1 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างไอโซเลต NS1-NS12 จาก NAN103 เมื่อถูกคัดเลือกโคโลนีเดียว

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13400.247	12	1116.687	11.130	.000
Within Groups	2608.562	26	100.329		
Total	16008.809	38			

ตารางที่ ฉ-2 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ของราชั่วนุ่นที่ 2

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	96745.640	27	3583.172	14.204	.000
Within Groups	7063.301	28	252.261		
Total	103808.941	55			

ตารางที่ ฉ-3 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ของราชั่วนุ่นที่ 6

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68497.207	27	2536.934	9.786	.000
Within Groups	14258.645	55	259.248		
Total	82755.852	82			

ตารางที่ ฉ-4 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและ
 มิวแทนต์จากการชักนำด้วยสาร NTG ของราชั้วรุ่นที่ 2

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25844.054	14	1846.004	53.096	.000
Within Groups	1043.015	30	34.767		
Total	26887.070	44			

ตารางที่ ฉ-5 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและ
 มิวแทนต์จากการชักนำด้วยสาร NTG ของราชั้วรุ่นที่ 6

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29841.114	14	2131.508	15.053	.000
Within Groups	4247.953	30	141.598		
Total	34089.067	44			

ภาคผนวก ข

ข้อมูล

ตารางที่ ข-1 ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกได้

รหัส	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต ¹ /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทिवิตีจำเพาะ (ยูนิต ¹ /มิลลิกรัม)
CU5	30.46±14.36	32.93±2.05	0.90±0.36
CU10	274.14±14.36	53.61±10.23	5.74±0.06
SKP101	5.13±1.88	1.05±0.67	5.84±2.37
SKP102	131.99±43.08	24.80±1.55	5.13±1.54
SKP203	64.30±14.36	16.60±2.25	3.71±0.24
PAI201	4.30±0.80	27.22±1.04	0.16±0.03
PAI203	125.22±4.79	18.98±1.67	6.43±0.39
PAI3O2	10.63±1.72	69.13±1.08	0.16±0.05
SEDI02	7.535±0.35	7.16±2.20	1.05±0.22
NAN101	25.85±1.43	5.74±0.30	4.52±0.47
NAN103	3185.63±74.60	36.31±0.65	87.73±0.99
NAN104	138.76±23.93	29.26±13.48	3.92±0.42
NAN106	115.07±19.15	26.38±3.57	4.05±0.47
NAN202	128.61±143.09	31.46±6.06	3.81±0.11
PI04	14.04±3.86	4.63±0.37	3.04±0.61
KB04	9.22±0.71	4.50±0.40	2.30±0.35
SVL03	22.87±3.72	5.50±0.38	4.14±0.45
SH03	2.582±0.50	14.64±4.16	0.18±0.05
SH04	128.61±9.57	16.38±1.13	7.72±0.09
KBP02	9.40±0.44	2.05±0.19	4.61±0.45
PFB1	2.83±0.56	36.20±0.79	0.10±0.01
PFB2	5.01±0.66	51.32±10.92	0.14±0.01
PFB3	3.83±0.15	25.22±2.84	0.45±0.06
PFC3	18.76±1.12	42.60±8.06	0.51±0.18
PS2	22.71±0.52	48.80±17.98	0.22±0.02

ตารางที่ ช-1 (ต่อ)

รหัส	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต ¹ /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต ¹ /มิลลิกรัม)
COA1	10.19±1.79	46.86±4.04	3.04±0.18
COA3	8.05±1.40	2.67±0.59	0.60±0.01
COBx	22.99±0.88	38.09±1.19	0.64±0.05
SSF5	8.11±0.92	12.62±0.45	0.56±0.02
SSFx	21.26±2.43	38.20±3.03	0.69±0.01
SSFy	21.70±0.31	31.26±0.96	0.07±0.01
SK101	8.82±0.33	35.60±1.86	0.25±0.02
SK102	7.535±0.35	7.16±2.20	1.05±0.22
SK103	10.46±1.54	35.23±5.71	0.30±0.07
SK104	8.05±0.30	18.83±1.99	0.43 ±0.04
SK105	15.92±0.64	52.07±2.68	0.31±0.02
SK106	3.81±0.36	30.21±2.99	0.13±0.02
SK107	13.83±0.22	28.11±2.12	0.49±0.03
SK108	29.56±0.49	11.95±1.64	2.47±0.40
MD100	2.73±0.62	13.14±1.13	0.21±0.04
MD101	11.94±0.46	29.66±5.39	0.40±0.06
MD102	4.64±0.23	30.21±0.15	0.15±0.04
MD103	7.05±0.56	22.16±1.26	0.32±0.08
YSH101	4.67±1.12	45.48±4.70	0.10 ±0.02
YSH102	4.36±0.59	8.05±3.12	0.54±0.09
YSH103	12.26±0.96	11.65±4.00	1.05±0.18
YSH104	48.92±0.81	28.11±7.07	1.74±0.81
YSH105	16.01±3.30	25.42±0.59	0.63±0.29
YSH106	18.07±0.51	34.43±0.42	0.52 ±0.14
YS100	12.00±0.67	26.02±5.37	0.46±0.08
YS103	14.12±0.61	19.43±2.96	0.73±0.09
YS104	15.87±1.11	14.34±2.78	1.11±0.20

ตารางที่ ซ-1 (ต่อ)

รหัส	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต ¹ /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต ¹ /มิลลิกรัม)
YS106	16.93±0.71	40.39±1.13	0.42±0.16
YS107	17.84±0.34	29.01±5.81	0.62±0.09
YS108	20.52±0.32	39.49±2.50	0.52±0.08

¹ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ ซ-2 ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราคีคัดเลือกโคโคไลน์เดี่ยว

รหัส	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต ¹ /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต ¹ /มิลลิกรัม)
NS1	6,044.03±57.24	11.25±1.43	85.97±3.36
NS2	5,208.56±87.86	11.81±3.27	97.90±3.43
NS3	6,055.64±119.09	6.80±0.62	100.85±3.25
NS4	9,482.63±110.69	6.73±0.39	132.64±7.68
NS5	5,239.50±96.62	9.52±1.31	86.63±3.47
NS6	5,471.58±483.24	9.09±0.57	81.10±7.76
NS7	7,672.43±323.45	7.42±1.10	115.25±8.88
NS8	6,782.81±177.63	8.43±0.57	121.80±23.48
NS9	6,152.34±602.95	7.74±1.14	97.01±8.35
NS10	3,688.46±53.60	5.72±0.07	70.03±11.15
NS11	5,986.02±75.50	6.89±0.40	95.03±16.42
NS12	3,189.50±104.00	4.68±0.07	66.44±3.19
NAN103	4,392.43±128.34	27.09±5.22	85.45±5.95

¹ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ ช-3 ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต

รหัส	ช่วงที่ 2			ช่วงที่ 6		
	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการทำงาน ของไลเพส (ยูนิต/ มิลลิกรัม)	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต/ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการทำงาน ของไลเพส (ยูนิต/ มิลลิกรัม)
UV501	3,819.97±98.46	25.77±2.42	148.71±10.13	3390.63±81.23	32.18±0.85	105.37±0.27
UV502	3,489.26±90.26	19.79±1.21	176.82±15.36	3220.44±93.79	34.46±10.59	100.49±34.49
UV503	5,113.80±8.21	30.68±2.12	167.07±11.78	4144.88±11.60	34.74±4.93	121.05±18.48
UV504	2,102.61±49.23	22.14±0.30	94.98±0.93	2539.69±48.31	30.61±5.58	84.54±13.03
UV505	3,930.21±57.44	24.91±2.42	158.61±17.69	3201.10±107.19	34.03±1.08	94.19±5.93
UV506	3,233.98±172.31	24.70±0.30	130.98±8.58	2814.31±29.20	31.89±0.65	88.26±1.82
UV507	3,204.97±410.26	28.33±1.21	112.91±9.66	3239.78±133.82	33.75±5.58	98.31±21.07
UV508	2,914.88±623.59	21.50±0.60	136.06±32.84	2412.04±87.86	47.14±4.08	51.43±4.97
UV509	2,352.09±8.21	27.26±0.91	86.31±2.57	3166.29±124.08	29.47±3.97	108.34±10.26
UV510	3,605.30±155.90	31.11±3.32	116.28±7.41	2609.31±113.89	41.44±4.22	63.21±3.52
UV511	3,210.77±57.44	25.98±0.30	123.59±3.65	2822.04±92.83	29.62±4.76	97.05±17.00
UV512	3,814.17±8.21	33.46±1.21	114.07±4.37	2779.50±112.70	30.75±0.49	90.42±4.82
UV513	4,852.71±164.10	28.76±3.63	169.72±15.69	2706.01±520.36	39.02±1.48	69.16±11.46
UV514	2,822.04±82.05	30.26±0.30	93.26±1.78	3584.03±199.75	32.61±4.12	110.85±1.96
UV515	3,698.13±123.08	30.04±1.81	123.20±3.34	3785.16±228.27	30.04±6.88	129.27±21.68
UV516	3,332.61±32.82	33.03±0.60	100.89±0.85	3371.29±153.21	30.33±1.93	111.31±4.93
UV517	4,278.32±188.72	26.41±1.51	162.06±2.13	2149.02±467.19	33.75±1.93	63.94±14.76
UV518	4,284.12±213.33	30.04±1.81	142.65±1.51	3015.44±90.13	32.75±3.09	92.48±6.40
UV519	3,042.52±131.28	28.97±2.72	105.69±14.45	2957.42±96.62	31.89±1.62	92.87±5.21
UV1001	5,589.55±24.62	27.69±0.91	201.94±5.72	2609.31±167.49	32.32±2.35	81.23±10.56
UV1501	5,427.10±57.44	30.04±2.42	181.16±12.67	3711.67±385.96	41.01±3.88	91.05±12.93
UV1502	6,134.93±106.67	26.62±0.60	230.44±1.22	3262.99±69.62	21.92±7.06	158.04±42.89
UV2001	4,771.48±131.28	23.85±0.30	200.08±2.97	3054.12±50.58	31.47±0.99	97.13±3.92
UV2002	6,471.44±8.21	28.12±2.12	230.80±17.65	3870.26±151.00	20.64±2.60	189.91±28.93
UV2501	5,711.39±131.28	30.90±4.83	187.48±33.59	2651.86±93.79	45.28±1.62	58.57±1.08
UV3001	6,541.06±352.82	30.26±2.72	216.54±7.80	2740.82±232.94	38.45±6.40	73.43±19.64
UV3002	5,438.70±205.13	31.75±1.81	171.38±3.33	2818.18±208.01	38.16±2.26	74.11±8.41
NS4	5,090.59±41.03	36.24±2.12	140.68±7.08	3355.82±92.10	32.61±0.43	102.92±2.90

ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ ช-4 ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกได้ ที่ผ่านการชักนำให้เกิด
 มีวเทชันโดยใช้สาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รหัส	ชั่วรุ่นที่ 2			ชั่วรุ่นที่ 6		
	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต'/มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการทำงาน ของไลเพส (ยูนิต'/ มิลลิกรัม)	ค่าแอกทिवิตี (ยูนิต'/มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการทำงาน ของไลเพส (ยูนิต'/ มิลลิกรัม)
NTG011	4,937.80±233.33	59.67±1.73	82.84±5.60	4,802.43±13.40	40.01±2.35	120.31±7.35
NTG012	4,434.97±232.94	51.41±1.48	86.39±6.80	3,448.65±20.10	51.27±16.41	71.46±19.64
NTG021	3,282.33±35.45	46.99±2.35	69.97±3.76	4,601.29±85.53	44.72±3.63	103.26±6.68
NTG022	4,941.67±215.64	53.26±3.88	93.14±8.33	4,709.60±40.75	58.11±13.39	84.25±20.89
NTG051	3,676.86±187.58	47.42±1.73	77.59±4.48	4,578.09±104.00	41.01±2.91	112.09±9.98
NTG052	3,158.56±53.18	45.71±3.21	69.34±5.41	3,707.80±120.78	37.74±2.38	98.64±9.30
NTG071	4,195.16±98.69	51.84±1.54	80.97±2.94	4,353.75±101.16	38.02±4.57	115.64±14.38
NTG072	3,127.61±105.29	50.13±2.26	62.42±1.60	3,348.08±107.82	35.46±0.99	94.54±5.76
NTG073	2,299.87±151.74	44.15±4.08	52.33±4.87	3,328.74±82.32	44.72±2.43	74.53±2.28
NTG074	2,145.16±400.68	51.98±1.23	41.36±8.31	2,806.57±53.60	31.32±2.80	90.07±8.03
NTG075	2,354.02±155.83	45.86±2.22	51.31±1.00	2,477.80±70.90	39.16±1.93	63.32±1.35
NTG091	3,564.69±121.15	56.54±4.82	63.43±6.92	4,508.46±246.24	48.70±12.92	97.01±25.25
NTG092	3,270.73±17.73	46.43±1.08	70.48±1.51	4,036.58±234.77	40.87±3.09	99.04±7.38
NTG093	323.36±48.31	50.98±2.26	6.38±1.18	601.85±29.20	51.27±2.15	11.74±0.15
UV2002	4,075±80.68	36.17±3.64	113.48±12.43	4,303.46±137.46	44.43±0.65	96.88±3.71

'ยูนิต:นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ ข-5 จำนวนราที่อยูรอดเมื่อคิดจากจำนวนเซลล์ในสารละลายเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซ็นต์อัตราการตายและอัตราการอยูรอด ที่ระยะเวลาจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงเวลา 0-30 นาที

เวลา (นาที)	จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร (เซลล์/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์อัตราการตาย (%)	เปอร์เซ็นต์อัตราการอยูรอด (%)
0	3.74×10^5	0	100.00
5	34.33	99.99	0.01
10	0.33	100.00	0.00
15	1.83	100.00	0.00
20	0.67	100.00	0.00
25	0.33	100.00	0.00
30	1.83	100.00	0.00

ตารางที่ ข-6 จำนวนราที่อยูรอดเมื่อคิดจากจำนวนเซลล์ในสารละลายเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซ็นต์อัตราการตายและอัตราการอยูรอด ของสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1-0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เวลา (นาที)	จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร (เซลล์/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์อัตราการตาย (%)	เปอร์เซ็นต์อัตราการอยูรอด (%)
0	2.57×10^5	0.00	100.00
0.1	1339.17	99.48	0.52
0.2	1446.67	99.44	0.56
0.5	1191.11	99.54	0.46
0.7	1533.33	99.40	0.60
0.9	580.00	99.77	0.23

ตารางที่ ข-7 ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ด้วยการเติมเมทานอลแบบสามชั้น (NAN103 T.) และต่อเนือง (NAN103 C.) โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (ก) ที่เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (ข)

(ก)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio
NAN103 T.	2.469	1310107	5.152	3345233	2.55
NAN103 C.	2.464	693171	4.696	1825076	2.63

(ข)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio
NAN103 T.	2.476	1876695	4.696	9819295	5.23
NAN103 C.	2.469	1305619	5.162	7001755	5.36

ตารางที่ ข-8 ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ชั่วโมงที่ 48 ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม ที่ชั่วโมงที่ 2 (ก) ชั่วโมงที่ 6 (ข)

(ก)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio	% relative
NS4 F2	2.463	1422248	5.062	6336185	4.46	100
UV2002 F2	2.460	1509200	5.130	2918108	1.93	43
NTG022 F2	2.480	1831947	5.154	3611638	1.97	44

(ข)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio	% relative
NS4 F6	2.486	1863593	5.097	5597159	3.00	100
UV2002 F6	2.456	1711051	5.156	3320412	1.94	65
NTG022 F6	2.481	2145268	5.142	6008336	2.80	93

ตารางที่ ข-9 ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ของเอโนไซม์ตรีงรูปของราไอโซเลต NAN103 บนวัสดุค้ำจุณโดโลไมต์ในปฏิริยามีนน้ำ (Immodo+W) และบนวัสดุค้ำจุณโดโลไมต์ในปฏิริยามีนน้ำชั่วโมงที่ 24 (ก) และ 48 (ข) เอโนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอโนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการเติมเมทานอลแบบต่อเนื่องทุกปฏิริยา

(ก)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio
NAN103	2.485	627200	5.053	17932	0.03
Immodo+W	2.474	1161703	5.774	15777	0.01
Immodi+W	2.489	951532	5.298	19305	0.02

(ข)

name	Ret. time of std.	Area of std.	Ret. time of ME	Area of ME	Area ratio
NAN103	2.460	564212	5.815	31179	0.06
Immodo+W	2.470	1342399	5.186	173889	0.13
Immodi+W	2.458	778537	5.400	107899	0.14

ภาคผนวก ซ

ตาราง ซ-1 ผล 5 อันดับแรกจากการตรวจสอบลำดับเบสบริเวณ ITS ของราไอโซเลต NAN103 ที่ได้มาจากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
AB255352.1	<i>Fusarium</i> sp. E033 gene for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1070	1070	100%	98%
AM412642.1	<i>Fusarium solani</i> , 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain FMR 7988	1063	1063	98%	99%
AM412640.1	<i>Fusarium solani</i> , 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain FMR 7242	1063	1063	98%	99%
AM412639.1	<i>Fusarium solani</i> , 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain FMR 7240	1063	1063	98%	99%
AM412638.1	<i>Fusarium solani</i> , 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain FMR 7238	1063	1063	98%	99%

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววราภรณ์ มลิลาศ เกิดวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาการศึกษาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2546 และระดับปริญญาโทเข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2547 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2549